2010 年 2 月改訂（第 2 版）

モリナガ FASPEK 特定原材料
ウエスタンブロットキット
操作マニュアル

株式会社　森永生科学研究所
〒236-0003　横浜市金沢区幸浦 2-1-16

※ 取扱説明書と併用してご活用下さい。

【はじめに】

食品衛生法関連法令の改正により、2001 年 4 月よりアレルギーを誘発する可能性が高い特定原材料 5 品目（卵、乳、小麦、そば、落花生）の表示が義務づけられ、さらに 2008 年 6 月 3 日の「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について」において、えび・かにが追加され、7 品目が特定原材料と定められました。通知では、特定原材料の表示が無く、通知のスクリーニング検査結果（ELISA 法）が陽性で、製造記録に特定原材料の記載が無い場合、確認検査の実施が義務付けられています。本キットは通知における検査結果の確認検査として選定された卵タンパク質および牛乳タンパク質検出用キットです。

【モリナガ FASPEK 特定原材料ウエスタンブロットキット】

- 卵ウエスタンブロットキット（卵白アルブミン）
- 卵ウエスタンブロットキット（オボムコイド）
- 牛乳ウエスタンブロットキット（β-ラクトグロブリン）
- 牛乳ウエスタンブロットキット（カゼイン）

【キットの特徴】

1. 卵タンパク質では卵白アルブミンまたはオボムコイドを指標とした、また牛乳タンパク質ではカゼインまたはβ-ラクトグロブリンを指標とした検出用ウエスタンブロットキット
2. 特定タンパク質に対する抗体を使用

【注意事項】

1. キットの試薬にはアレルゲン性を有する特定原材料やウシ血清アルブミンを使用しています。これらのタンパク質アレルギーのある方は、本キットを使用する際、試薬の取り扱いに十分に注意し、慎重に測定操作を行って下さい。

2. 測定は埃などが除去された清潔な環境で行って下さい。また、実験に用いる器具類は、汚染の無いよう使用前に十分洗浄した物を用いて下さい。手からの汚染を防ぐため、実験中は使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。

3. 免疫染色時の洗浄操作は、良好な解析結果を得る上で重要です。一回の洗浄操作でなるべく多量の洗浄液を用いて下さい。(洗浄操作 1 回につき 50〜100mL が目安です。)

【測定のフローチャート】

Ⅰ.サンプル及び各種試薬類の調製

↓

Ⅱ.ポリアクリルアミドゲル電気泳動:サンプル中のタンパク質を、その分子量に従って分離する。

(60 mA/gel、室温)

↓

Ⅲ.ブロッティング:ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したタンパク質を電気的に転写膜へ転写する。

(15V、1 時間、室温)

↓

Ⅳ.免疫染色

ブロッキング:特定原材料に対するウサギ抗体(一次抗体)が非特異的に転写膜へ結合するのを防ぐため、ウシ血清アルブミンで転写膜をブロッキングする。

(1 時間、室温、振とう もしくは一晩、4℃、静置)

↓

一次反応：一次抗体が、転写膜上の特定原材料に結合し、[特定原材料/一次抗体]の

複合体が形成する。

（1 時間、室温、振とう）

↓

洗浄（5 分、3 回）

↓

二次反応：ビオチン標識二次抗体が複合体中の一次抗体と結合する。

（30 分、室温、振とう）

↓

洗浄（5 分、3 回）

↓

三次反応：アルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン複合体がビオチン標識

二次抗体と結合する。（20 分、室温、振とう）

↓

洗浄（5 分、3 回）

↓

100 mM Tris/塩酸（pH9.5）で洗浄（15 分、室温、振とう）

↓

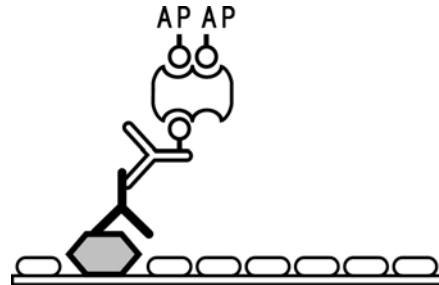
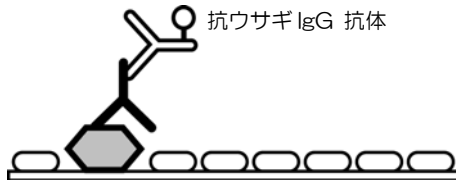
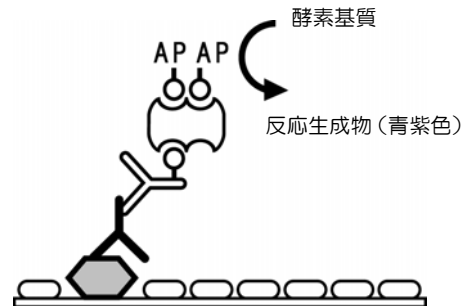
酵素反応：検出試薬を添加すると、転写膜上の複合体に結合したアルカリホスファターゼ

により試薬中の基質が呈色し、膜上に青紫色のバンドとして沈着する。

（3〜10 分、室温、振とう）

↓

精製水で洗浄、保存（15 分、室温、振とう）

〈免疫反応の模式図〉
① ブロッキング
卵白アルブミン
ウシ血清アルブミン
② 一次反応
ウサギ抗卵白
アルブミン抗体
③ 二次反応
ビオチン標識
抗ウサギ IgG 抗体
④ 三次反応
ｱﾙｶﾘﾌｫｽﾌｧﾀｰｾﾞ標識
ﾋﾞｵﾁﾝｰｱﾋﾞｼﾞﾝ複合体
AP AP
⑤ 酵素反応
酵素基質
AP AP
反応生成物（青紫色）

【測定法】

試薬はすべて室温に戻してから使用して下さい。

Ⅰ.サンプル及び各種試薬類の調製

1. ローディング緩衝液の調製

Laemmli Sample Buffer と2-メルカプトエタノールを 19:1 で混和したものを用います。

※Laemmli Sample Buffer は SDS が入っており、低温で沈殿します。加温溶解してから使用して下さい。

2. 検体抽出液の調製

A 抽出用 A 液、B 抽出用 B 液、C 検体希釈液、精製水を 1:1:1:17 の比率で混合します。必要量を調製して下さい。

※モリナガ FASPEK 特定原材料測定キットに付属の H 抽出用 A 液、I 抽出用 B 液、F 検体希釈液と同一の組成です。

※A 抽出用 A 液に沈殿が生じている場合は加温溶解してからご使用ください。溶解後は室温で保存可能です。

3. 泳動用サンプルの調製

(1) 検体をミキサー等で粉砕し、均質化操作を行います。

(2) 均質化された検体 1 g をプラスチック製 50 mL 容遠心管に取り、検体抽出液 19 mL を加えてよく振り混ぜて混合します。この際にあまり泡立たせないように注意しながら、ボルテックスミキサー等を用いて検体を分散させます。

(3) 遠心管を横にして振とう機で一晩(12 時間以上)振とうしながら抽出します。(90～110 往復ストローク/分、液が遠心管の両端に打ちつけるように調整します。時々遠心管の上下を入れ替える等をして、液面に沿って付着する検体を分散させます。

(4) 抽出液の pH を確認し、必要であれば中性付近(pH 6.0～8.0)になるように調整します(pH 試験紙で結構です)。

(5) 3,000×g 以上で 20 分間、室温で遠心分離し、上清を分取します。沈査が得られない場合は、ろ過し、抽出液とします。

(6) この抽出液と 1.「ローディング緩衝液の調製」で調製したローディング緩衝液を 1:2 で混和し、沸騰水浴中で 5 分間加温したものを泳動用サンプルとします

4. 標準品の調製

(1)　2.「検体抽出液」で調製した検体抽出液と、1.「ローディング緩衝液の調製」で調製したローディング緩衝液を1:2で混和し、沸騰水浴中で5分間加温して標準品の希釈液を作製します。

(2)　D 卵(牛乳)標準品(10μg/mL)を終濃度が1μg/mL及び0.5μg/mLになるように(1)で作成した希釈液にて調製して下さい

※ 検査結果の判定基準に1μg/mLのバンド検出の確認が必要です。

5. 泳動用緩衝液の調製

Tris-BES泳動バッファー(10x) (TEFCO)を精製水で10倍に希釈して使用します。

※ 1回の泳動におよそ500mL使用します。

6. 転写用緩衝液の調製

10×Tris/Glycine(BIO-RAD社製)、メタノール、精製水を1:2:7の比で混和して使用します。

※ 転写膜1枚あたりおよそ150mL使用します。

※ 濃縮緩衝液と精製水を混合してからメタノールを加えて下さい。濃縮緩衝液とメタノールを先に混合すると塩が析出する場合があります。

7. 洗浄液の調製

10×TBS(BIO-RAD社製)を精製水で10倍に希釈します。この溶液にTween-20を終濃度が0.05%になるように添加して下さい。

※ ブロッキング溶液の調製には調製済み洗浄液を使用します。

※ 洗浄、ブロッキング溶液用に、転写膜1枚あたりおよそ1,000mL使用します。

8. ブロッキング溶液の調製

調製済み洗浄液にウシ由来血清アルブミンを終濃度が0.1%になるように添加して下さい。

※ 転写膜のブロッキングや抗体溶液の調製には調製済みブロッキング溶液を使用します。

9. 一次抗体溶液の調製

E ウサギ抗卵白アルブミン抗体溶液（特定原材料に対するウサギ抗体溶液）を調製済みブロッキング溶液で 100 倍に希釈します。必要量を調製して下さい。

10. 二次抗体溶液の調製

VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit（VECTOR 社製）中のビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体をブロッキング溶液で 10,000 倍に希釈します。必要量を調製して下さい。

11. アルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン溶液の調製

VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit 構成品の A 液をブロッキング溶液 10 mL 対して 1 滴の割合で混和します。この溶液に、さらにこの溶液 10 mL に対して同キット構成品の B 液を 1 滴の割合で混和します。必要量を調製して下さい。

※ ビオチン-アビジン複合体生成のため、当溶液は使用する 30 分前に調製して下さい。

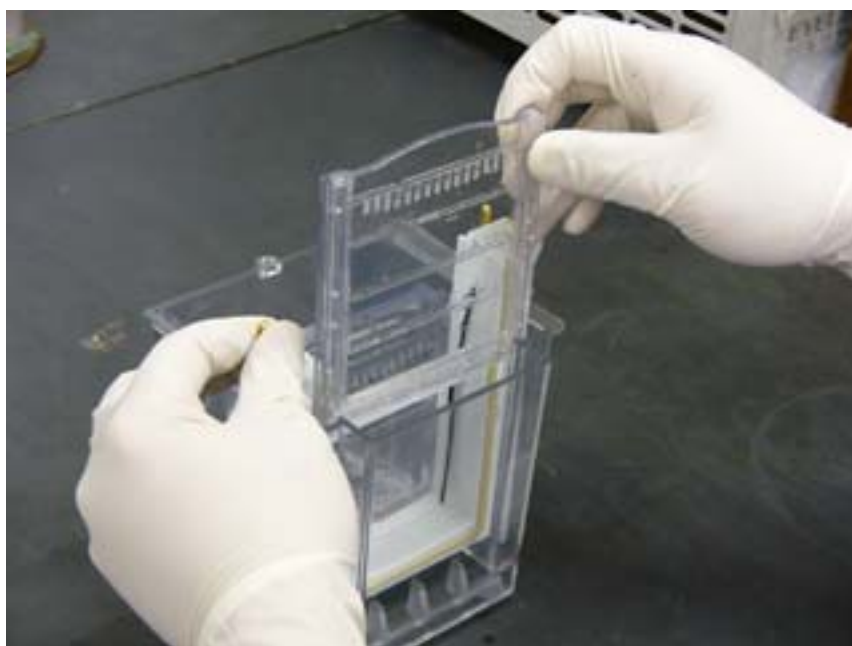
12. 検出試薬の調製

Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV <BCIP/NBT>（VECTOR 社製）中の 1 液を、100 mM Tris/塩酸（pH9.5）10 mL に対して 2 滴の割合で混和します。さらにこの溶液 10 mL に対して、2 液と 3 液を 2 滴の割合で順次混和して用います。

※免疫染色に用いる各試薬溶液は、転写膜 1 枚あたり 20 mL が目安です。

Ⅱ.ポリアクリルアミドゲル電気泳動

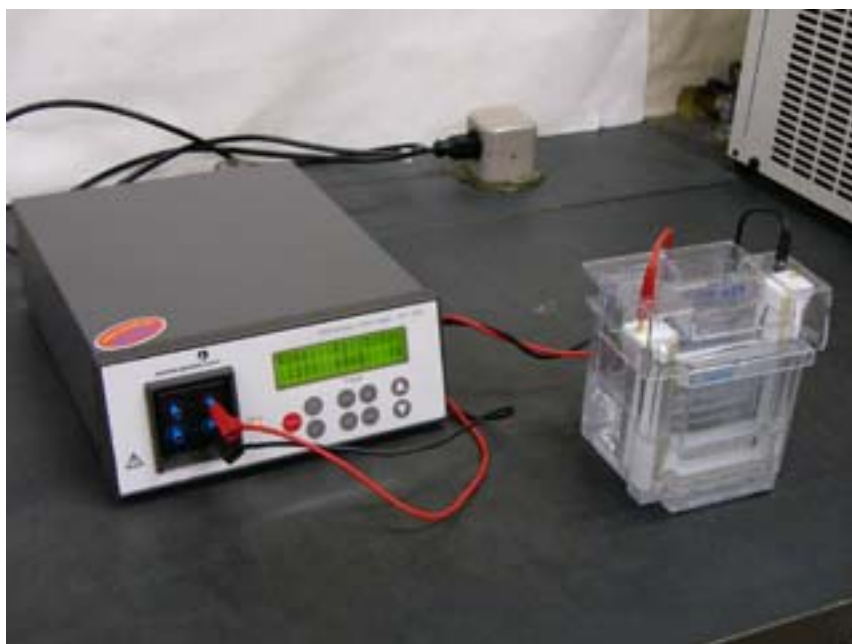
1. ポリアクリルアミドゲルプレートを袋から取り出して開口部のシールをはがし、コームを静かに抜きます。

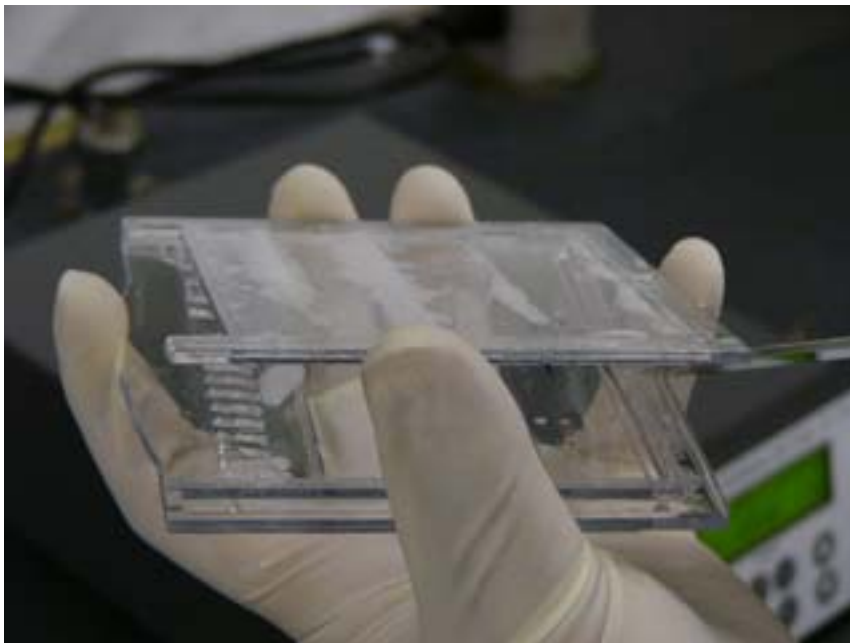
2. ゲルプレートを電気泳動槽にセットし、各ウェルが完全に浸るまで泳動用緩衝液を注ぎます。

※ 液漏れのないことを確認して下さい。

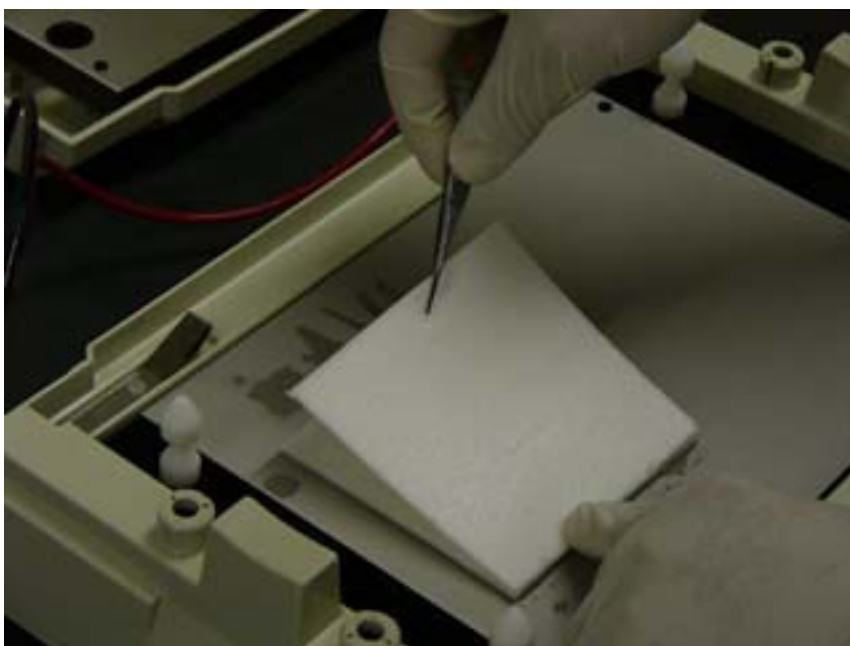
3. ゲルのウェルに分子量マーカーを7μL、卵または牛乳標準品（10μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL）及びサンプルを20μLずつ注入します。

※ 注入の際に試料が隣のウェルに混入しないよう注意して下さい。

※ 泳動する際スマイリングしないように流して下さい。

4. 上部バッファー槽に酸化防止剤（x400）を400倍希釈になるように添加した後、ゲルプレート1枚あたり60mAの定電流で泳動します。ローディング緩衝液に含まれるブロモフェノールブルーがゲルの下端から1cmのあたりまで進んだところで泳動を終了します。

Ⅲ.ブロッティング

1. ゲルカッターを用いてカセットを開け、中のゲルを取り出します。

2. ゲルの凸部分（開口部）及び濃縮ゲル部分を取り除き、転写用緩衝液に浸します。

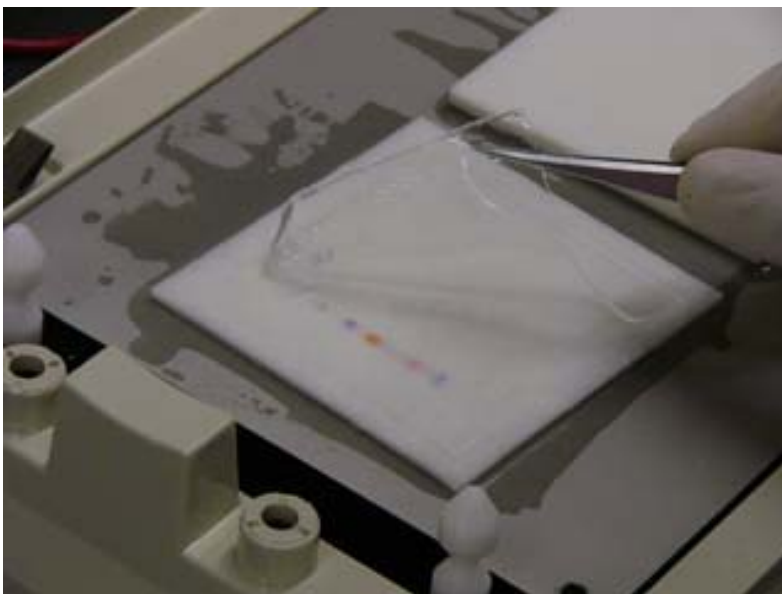
3. 転写膜、ろ紙 2 枚とゲルを、転写装置の陽極面からろ紙、転写膜、ゲル、ろ紙の順に重層します。

※ ろ紙は予め 30 分間転写用緩衝液に浸しておきます。また、転写膜はメタノールに数

十秒間浸してから転写用緩衝液に 30 分間浸して使用します。

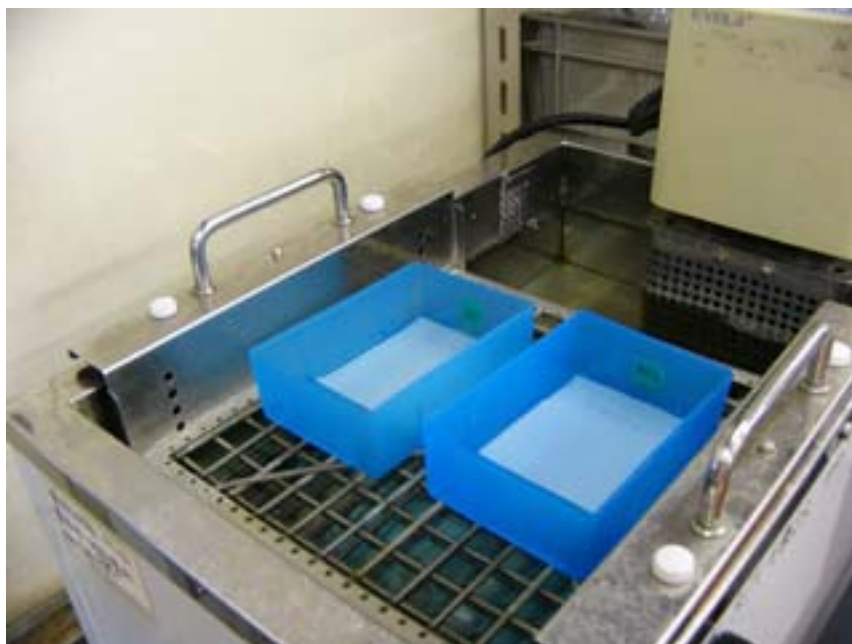
※ 気泡が入った部分は転写されないため、転写膜、ゲル等を重層する際注意して下さい。

※ ゲルの乾燥を防ぐために、作業は速やかに行って下さい。

4. 陰極のついた上部蓋を閉じ、15 V の定電圧で 60 分間転写します。

5. 転写終了後、分子量マーカーの分子量約 38 kDa（紫）、31 kDa（オレンジ）のバンドが転写膜上に転写されていることを確認して下さい。

※分子量約 201 kDa（青）、125 kDa（マゼンタ）など高分子量側のバンドは完全には転写膜へ転写されない場合があります。

Ⅳ.免疫染色

1. 転写後の膜を速やかにブロッキング溶液に浸し、1 時間振とうします。

※室温で 1 時間振とうする代わりに 4℃で一晩静置することも可能です。

2. ブロッキング溶液を捨て、膜を一次抗体溶液に浸して 1 時間振とうします。

3. 反応後、一次抗体溶液を捨てて適量の洗浄液を加え、5 分間振とうします。この洗浄操作を 3 回繰り返します。

4. 洗浄液を捨て、膜を二次抗体溶液に浸して 30 分間振とうします。反応後、洗浄液で 5 分間 3 回洗浄します。

5. 膜をアルカリホスファターゼ標識ビオチン-アビジン溶液に浸し、20 分間振とうします。反応後、洗浄液で 5 分間 3 回洗浄します。

6. 膜を 100 mM Tris/塩酸（pH9.5）に 15 分間浸した後、液を捨てて検出試薬に 3〜10 分間浸し、目的タンパク質のバンドを検出します。

   ※ バックグラウンドが高くならないよう注意して下さい。

7. バンドが十分濃くなったら検出試薬を取り除き、精製水で膜をすすいだ後に遮光しながら精製水中で 15 分間振とうして洗浄します。洗浄操作の終わった膜は風乾し、遮光下で保存可能です。

【結果の判定】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動における標的タンパク質の見かけ上の分子量（卵白アルブミン：MW 50,000、オボムコイド：MW 38,000、カゼイン：MW 33,000-35,000、β-ラクトグロブリン：MW 18,400）付近に明瞭なバンドが検出された場合を陽性と判断します。
なお、陽性対照として検査ごとに卵または牛乳標準品（1μg/mL）が検出されているかどうか確認して下さい。標準品（1μg/mL）が検出されない場合は検査が不適であると考え、再度サンプル調製から行って下さい。
卵の場合は卵白アルブミンあるいはオボムコイド、牛乳の場合はカゼインあるいはβ-ラクトグロブリンのどちらか一方の抗体を用いた検査が陽性であれば、各特定原材料（卵、牛乳）が微量を超えて混入していると判断します。